

①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 49 277 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 07 K 14/76
C 07 K 1/22

②① Aktenzeichen: 197 49 277.0
②② Anmeldetag: 7. 11. 97
④③ Offenlegungstag: 20. 5. 99

DE 197 49 277 A 1

⑦① Anmelder:
Universität Leipzig, 04109 Leipzig, DE

⑦④ Vertreter:
Nenning, P., Dipl.-Chem. Dipl.-Jur.Dr.rer.nat.Dr.jur.,
04275 Leipzig

⑦② Erfinder:
Mothes, Thomas, Dr., 04105 Leipzig, DE; Osman,
Awad, Dr., 04107 Leipzig, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
EP 6 57 470 A2
EP 3 19 067 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zum Abtrennen von Albumin aus biologischen Flüssigkeiten

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Peptid mit der Sequenz
H₂N-Phe-His-Glu-Asn-Trp-Pro-Ser-COOH. Peptide mit die-
ser Sequenz sind geeignet, Albumin aus biologischen
Flüssigkeiten abzutrennen.

DE 197 49 277 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Abtrennen von Albumin aus biologischen Flüssigkeiten zum Zwecke der Reinigung solcher Lösungen.

Zum Abtrennen von Albumin aus wäßrigen Lösungen, insbesondere aus biologischen Flüssigkeiten, sind zwei Arten von Verfahren bekannt: die Ionenaustauschchromatographie und die Affinitätschromatographie. Beide Verfahren sind zur Albuminentfernung aus Lösungen der beschriebenen Art geeignet, jedoch weisen sie einige Nachteile auf.

Die Ionenaustauschchromatographie ist als Methode zum Abtrennen von Albumin unspezifisch und erfordert in ihrer Anwendung und Durchführung einen hohen Zeitaufwand. Die zu geringe Spezifität ist darin begründet, daß die elektrischen Ladungen des Albumins und weiterer Gemischkomponenten ähnlich sind, diese deshalb im Chromatographieprozeß nicht differenziert werden können. Der hohe Zeitaufwand erklärt sich aus der methodisch notwendigen Arbeitsweise. Es ist erforderlich, die Lösung in Fraktionen zu trennen, den Albumingehalt in den Fraktionen zu bestimmen und die albuminfreien Fraktionen wieder zu vereinigen. Dabei ist die Peakidentifikation mühsam und aufwendig, auch zeitaufwendig.

Ein weiterer Nachteil der Ionenaustauschchromatographie ist darin zu sehen, daß die Arbeitsweise notwendig zu einer Instabilität der Analysenlösung führt. Die Ursache liegt in der notwendigen Pufferzuführung und der dadurch bedingten Ionengradientenänderung. Diese muß aber während des Trennprozesses kompensiert werden. Das erfolgt durch Einbringen weiterer Fremdstoffe in die Lösung, was zwangsläufig zur Instabilität derselben führt.

Die Affinitätschromatographie wird ebenfalls zur Abtrennung von Albumin aus biologischen Flüssigkeiten eingesetzt. Eine dabei angewendete Methode ist die Abtrennung des Albumins mit monoklonalen Antikörpern, eine zweite die Verwendung von Farbstoffen wie Cibacronblau oder dergleichen.

Der Einsatz monoklonaler Antikörper verspricht aus theoretischen Überlegungen heraus guten Erfolg. Dieser hat sich aber nicht eingestellt. Es hat sich gezeigt, daß die monoklonalen Antikörper letztlich zu teuer sind. Das ist in ihrer Herstellung begründet. Auch wenn die Hybridome in vitro kultiviert werden, sind die Antikörper nur aufwendig abzutrennen und zur Verfügung zu stellen. Des weiteren hat sich gezeigt, daß die monoklonalen Antikörper in ihrem Einsatz zur Albuminabtrennung nur eine geringe Lebensdauer aufweisen. Das ist dadurch bedingt, daß sie bei Mehrfachnutzung denaturieren. Weiterhin ist es so, daß sie schon bei längerfristiger Aufbewahrung in ihrer Aktivität merklich nachlassen und deshalb als kommerzielles Produkt ausfallen.

Der Einsatz von Farbstoffen in der Affinitätschromatographie erfüllt die Erwartungen ebenfalls nicht, weil Cibacronblau und andere verwendete Farbstoffe unspezifisch sind. Albumin wird mit oder neben vielen anderen Proteinen abgetrennt, weil ihre Wechselwirkung mit dem Farbstoff ähnlich ist. Weiterhin ist nachteilig, daß die Trennleistung recht schnell nach läßt. Die Ursache liegt in der nur unzureichend zu verwirklichenden Immobilisierung des Farbstoffs an einem Trägermaterial. Die Säule "blutet aus" und bringt keine Leistung mehr.

Die Erfindung hat den Zweck, ein Verfahren zur Abtrennung von Albumin aus biologischen Flüssigkeiten anzubieten, das ein spezifisches Abtrennen des Albumins ermöglicht. Es soll schnell ablaufen und die biologische Flüssigkeit soll stabil bleiben. Das Verfahren muß kostengünstig arbeiten, das zur Verfügung gestellte Adsorbens soll langfristig haltbar sein und eine dauerhafte Trennleistung sichern.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, in einem Verfahren, das seinem Wesen nach ein affinitätschromatographisches Verfahren bleibt, eine spezifische Bindung zwischen Albumin und dem Adsorbens herzustellen. In nur wenigen Arbeitsschritten soll eine biologische Flüssigkeit albuminfrei erhalten werden. Es soll unter physiologischen Bedingungen gearbeitet werden und das mit einer langfristig stabilen Matrix.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß eine albuminhaltige biologische Flüssigkeit auf eine chromatographische Säule aufgegeben wird, die mit einer Füllung aus an sich bekanntem Trägermaterial beschickt worden ist, welches aus Agarose in Kugelform, Polyacrylbeads, Silicagel oder dergleichen besteht. Das Trägermaterial ist mit chemisch aktiven Gruppen modifiziert wie zum Beispiel

A. EAH-Sepharose 4B in Anwesenheit von Carbodiimid (Firma Pharmacia)

B. Affigel 102 in Anwesenheit von Carbodiimid (Firma BioRad)

oder dergleichen. Das derart vorbereitete Trägermaterial wird mit einer Peptidlösung inkubiert, wobei das Peptid erfindungsgemäß eine definierte Sequenz von H_2N -Phe-His-Glu-Asn-Trp-Pro-Ser-COOH aufweist. Nach Blockieren der freien aktiven Gruppen am Trägermaterial wie z. B. Agarose oder dergleichen wird mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und das Trägermaterial in die Säule eingeschwemmt. Die aufgegebene albuminhaltige biologische Flüssigkeit passiert die Säule. Das albuminfreie Eluat wird gesammelt. Die Säule wird nach erfolgter Beladung regeneriert, indem man die Säule mit einem Puffer (200 mM Glycin-HCl, pH 2,2) wäscht. Anschließend wird die Säule mit PBS neutral gewaschen.

Das erfindungsgemäße Abtrennen von Albumin aus biologischen Flüssigkeiten ist ebenso im batch-Verfahren möglich.

Das Verfahren kann auch verwendet werden, um Albumin in reiner Form aus biologischen Flüssigkeiten zu isolieren.

Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, daß unerwartet und aufgrund theoretischer Überlegungen nicht vorhersehbar die Peptidsequenz H_2N -Phe-His-Glu-Asn-Trp-Pro-Ser-COOH für die Bindung des Albumins verantwortlich ist. Erfindungsgemäß ist deshalb ebenfalls die Sequenz, ein Peptid, bestehend aus dieser Sequenz und generell Peptide, die diese Sequenz enthalten.

Peptide, die die bezeichnete erfindungsgemäße Sequenz enthalten, sind nach an sich bekannten Methoden herstellbar.

Die Erfindung soll nachstehend an Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne auf diese beschränkt zu sein.

Ausführungsbeispiel

1. 16 mg des oben genannten Peptids werden mit 8 ml EAH-Sepharose 4B in Anwesenheit von Carbodiimid inkubiert. Das so hergestellte Trägermaterial ist bis zur Anwendung durch Zusatz von 0,02% Thimerosal bei 4°C stabil.

2. Das Trägermaterial (8 ml) wird in eine handelsübliche Chromatographiesäule gefüllt und mit PBS neutral gewaschen.

3. Albuminhaltige biologische Flüssigkeiten werden über die Säule gegeben. Ein Milliliter des Trägermaterials kann 20 µg Albumin binden.

4. Der albuminfreie Säulendurchlauf wird gesammelt.

5. Zur Regeneration wird die Säule mit 4 Säulenvolu-

men Puffer (200 mM Glycin-HCl, pH 2,2) und anschließend mit 5 Säulenvolumen PBS gewaschen.

Patentansprüche

5

1. Verfahren zum Abtrennen von Albumin aus biologischen Flüssigkeiten, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine albuminhaltige biologische Flüssigkeit über eine chromatographische Säule gegeben wird, die ein Trägermaterial enthält, das nach an sich bekannter Vorbehandlung mit einem Peptid der Sequenz $\text{H}_2\text{N-Phe-His-Glu-Asn-Trp-Pro-Ser-COOH}$ beladen worden ist, das albuminfreie Eluat gesammelt wird und die Säule regeneriert wird. 10
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Beladung des Trägermaterials mit einem beliebigen Peptid erfolgt, sofern es nur die Sequenz $\text{H}_2\text{N-Phe-His-Glu-Asn-Trp-Pro-Ser-COOH}$ enthält. 15
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Chromatographie im batch-Verfahren durchgeführt wird. 20
4. Peptid, die Sequenz $\text{H}_2\text{N-Phe-His-Glu-Asn-Trp-Pro-Ser-COOH}$ enthaltend.
5. Peptid, aus der Sequenz $\text{H}_2\text{N-Phe-His-Glu-Asn-Trp-Pro-Ser-COOH}$ bestehend. 25
6. Chromatographiematerial zum Abtrennen von Albumin aus biologischen Flüssigkeiten, dadurch gekennzeichnet, daß ein übliches Trägermaterial mit einem Peptid beschichtet ist, das die Sequenz $\text{H}_2\text{N-Phe-His-Glu-Asn-Trp-Pro-Ser-COOH}$ enthält. 30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -